



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>4</sup> : C12N 15/00, 5/00, C12P 21/02 C07K 15/04, 15/06, G01N 33/569 A61K 39/21, 39/285		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 87/07642 (43) Date de publication internationale: 17 décembre 1987 (17.12.87)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR87/00219 (22) Date de dépôt international: 15 juin 1987 (15.06.87)	(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regime-beau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, DK, JP, KR, US.
(31) Numéro de la demande prioritaire: 86/08698 (32) Date de priorité: 16 juin 1986 (16.06.86) (33) Pays de priorité: FR	Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</i>		
(71) Déposants ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 16, rue Henri Regnault, F-92400 Courbevoie (FR). INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25, rue du Docteur-Roux, F-75015 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): KIENY, Marie-Paule [FR/FR]; 1, rue de Gascogne, F-67100 Strasbourg (FR). GUY, Bruno [FR/FR]; 18, rue Ste Madeleine, F-67000 Strasbourg (FR). LECOCQ, Jean-Pierre [BE/FR]; 6, rue du Champ du Feu, F-67116 Reichstett (FR). MONTAGNIER, Luc [FR/FR]; 21, rue de Malabry, F-92350 Le Plessis-Robinson (FR).			
(54) Title: VACCINE CONTAINING THE PROTEIN F OF THE AIDS VIRUS			
(54) Titre: VACCIN, CONTENANT LA PROTEINE F DU VIRUS DU SIDA			
(57) Abstract			
Viral vector characterized in that it comprises at least one portion of the genome of a virus, a gene coding for the protein F of the virus responsible for AIDS, as well as the elements providing for the expression of said protein in cells. Said viral vector may be used as vaccine in the treatment, prevention and diagnosis of AIDS.			
(57) Abrégé			
Vecteur viral caractérisé en ce qu'il comporte au moins une partie du génome d'un virus, un gène codant pour la protéine F du virus responsable du SIDA, ainsi que les éléments assurant l'expression de cette protéine dans des cellules. Ce vecteur viral peut être utilisé à titre de vaccin dans le traitement, la prévention et le diagnostic du SIDA.			

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Lichtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

Vaccin, contenant la protéine F du virus du SIDA.

La présente invention concerne plus particulièrement un vaccin destiné à la prévention du SIDA.

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une affection virale qui présente maintenant une importance majeure en Amérique du Nord, en Europe et en Afrique centrale.

5 Les estimations récentes suggèrent qu'environ 1 million d'américains peuvent avoir été exposés au virus du SIDA. Les individus affectés présentent une immunodépression sévère et la maladie est, en général, fatale.

10 La transmission de la maladie s'effectue le plus souvent par contact sexuel, bien que les personnes utilisant des stupéfiants par voie intraveineuse représentent également un groupe à haut risque ; d'autre part, un grand nombre d'individus ont été infectés par ce virus après avoir reçu du sang ou des produits sanguins contaminés.

15 L'agent causal de cette affection est un rétrovirus. De nombreuses affections animales ont été attribuées aux rétrovirus, mais c'est seulement récemment que des rétrovirus affectant des hommes ont pu être décrits.

20 Alors que des rétrovirus des cellules T humaines (HTLV : human T leukemia virus) de types I et II ont été impliqués comme agent causal de certaines leucémies des cellules T chez les adultes, le rétrovirus associé à des lymphadénopathies (virus LAV), qui est également appelé virus HTLV III ou A.I.D.S.-related virus (ARV), est maintenant couramment accepté comme l'agent responsable du SIDA.

25 Le génome de plusieurs isolats du rétrovirus LAV ou HTLV III a été caractérisé de façon très complète (Wain-Hobson et al., 1985 ; Ratner et al., 1985 ; Muesing et al., 1985 ; Sanchez-Pescador et al., 1985) et des informations sur la séquence génomique indiquent une relation étroite avec le groupe des lentivirus. Les lentivirus, dont le prototype est le virus ovin Visna, sont les agents de maladies à progression très lente et qui présentent typiquement une période d'incubation prolongée. Le LAV et le virus Visna partagent de nombreuses similarités, en particulier dans leur tropisme pour le tissu neural.

En plus des trois parties de génome retrouvées chez tous les rétrovirus et désignées gag, pol et env, le virus LAV comporte au moins trois autres gènes dénommés Q ou Ser, TAT et F ou 3'orf (Wain-Obson et al., 1985 ; Arya et al., 1986). Le produit du gène F a été caractérisé par réaction avec des serums de malades atteints de SIDA et l'identité de la protéine confirmée par un séquençage direct des acides aminés (Allan et al., 1985).

Selon les auteurs, la protéine F est reconnue par 30 à 90 % des sérum de malades. Cette protéine migre sur un gel d'acrylamide SDS 10 selon un poids moléculaire apparent compris entre 26 et 28 kD. Certains auteurs ont mis en évidence un produit du gène F compris entre 24 et 25 kD, évoquant la possibilité d'une initiation de la traduction au deuxième ATG.

La protéine F n'est pas glycosylée, bien que deux sites 15 potentiels de N-glycosylation soient présents. Enfin, il a été démontré que la protéine F est acylée par l'acide myristique. Il existe sur la protéine F un tetrapeptide (Arg - Phe - Asp - Ser), retrouvé sur certaines protéines intervenant dans l'adhésion cellulaire, et également sur une chaîne de l'antigène HLA de classe II.

Auffray (Auffray, 1986) a évoqué la possibilité pour la protéine F de jouer un rôle dans la reconnaissance et l'attachement de la protéine env et du virus LAV aux lymphocytes T4, contribuant ainsi à la dissémination du virus. De plus, la variabilité élevée (2 à 17 %) de la protéine F d'une souche à l'autre, variabilité comparable à celle de la glycoprotéine d'enveloppe, laisse à penser que la protéine F joue effectivement un rôle dans l'infection (Ratner et al., 1985).

La présente invention propose d'utiliser comme vecteur d'expression de la protéine F un vecteur viral permettant l'expression de la protéine dans un environnement qui permettra sa restructuration post-traductionnelle.

C'est pourquoi la présente invention concerne un vecteur viral, caractérisé en ce qu'il comporte le gène F du virus responsable du SIDA.

Parmi les vecteurs viraux utilisables, il faut citer plus particulièrement les poxvirus et, notamment, le virus de la variole (VV).

Le virus de la vaccine est un virus à ADN double brin qui a été utilisé très largement dans le monde entier pour contrôler et éradiquer la variole. Des développements techniques récents ont permis le développement de ce virus comme vecteur de clonage et des virus recombinants vivants ont 5 permis d'exprimer des antigènes étrangers et même d'obtenir des immunisations contre différentes maladies virales ou parasitaires.

Ainsi, plusieurs groupes ont récemment mis en évidence l'utilisation de recombinants de ce type pour exprimer l'antigène de l'Influenza, de l'hépatite B et la glycoprotéine de la rage pour immuniser 10 contre ces maladies (Smith et al., 1983 ; Panicali et al., 1983 ; Kiney et al., 1984).

L'expression d'une séquence codant pour une protéine étrangère par le virus de la vaccine (VV) implique nécessairement deux étapes :

- 15 1<sup>o</sup>) la séquence codante doit être alignée avec un promoteur de VV et être insérée dans un segment non essentiel de l'ADN de VV, cloné dans un plasmide bactérien approprié ;
- 2<sup>o</sup>) les séquences d'ADN de VV situées de part et d'autre de la séquence codante doivent permettre des recombinaisons homologues in vivo entre 20 le plasmide et le génome viral ; une double recombinaison réciproque conduit à un transfert de l'insert d'ADN du plasmide dans le génome viral dans lequel il est propagé et exprimé (Panicali et Paoletti, 1982 ; Mackett et al. 1982 ; Smith et al., 1983 ; Panicali et al., 1983).

Bien entendu, l'utilisation de ce type de vecteur implique 25 souvent une délétion partielle du génome du virus vecteur.

La présente invention concerne plus particulièrement un vecteur viral caractérisé en ce qu'il comporte au moins :

- une partie du génome d'un virus vecteur,
- un gène codant pour la protéine F du virus responsable du SIDA,
- 30 - ainsi que les éléments assurant l'expression de cette protéine dans les cellules.

L'invention concerne également les ADN recombinants correspondant auxdits vecteurs viraux.

Par "virus responsable du SIDA", on entend notamment désigner le virus LAV, le virus HTLV III ou ARV, de même que d'éventuels mutants ponctuels ou des délétions partielles de ces virus, ainsi que les virus apparentés.

5 Les vecteurs viraux, dans la partie correspondant au génome du virus vecteur (distinct du virus responsable du SIDA), peuvent être constitués à partir du génome d'un virus d'origine quelconque. Toutefois, on préférera utiliser une partie du génome d'un poxvirus et plus particulièrement une partie du génome de la vaccine.

10 Les conditions nécessaires pour l'expression d'une protéine hétérologue dans le virus de la vaccine ont été rappelées précédemment.

15 De façon générale, le gène en cause, par exemple le gène F, devra, pour pouvoir être exprimé, être sous la dépendance d'un promoteur d'un gène de la vaccine, ce promoteur sera en général le promoteur de la protéine 7,5K de la vaccine. En outre, la séquence codante devra être clonée dans un gène non essentiel de la vaccine qui pourra éventuellement servir de gène marqueur. Dans la plupart des cas, il s'agira du gène TK.

20 La protéine F native ne possède pas de signal d'excration et n'est pas glycosylée. On propose ici des modifications de ce gène pour améliorer l'immunogénicité du produit d'expression.

On propose de modifier le gène F de façon à assurer son excréion hors de la cellule, et, d'autre part, pour une troisième construction, à assurer l'ancrage de la protéine dans la membrane.

25 Pour ce faire, le gène pourra être modifié au niveau de sa partie codant pour l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale de la protéine en ajoutant une séquence signal qui provient d'un virus hétérologue, par exemple la séquence signal de la glycoprotéine du virus rabique. Ceci permettra l'excration de la protéine hors de la cellule.

30 Il est bien entendu que l'on peut utiliser une séquence signal provenant d'autres protéines virales.

Enfin, il peut être intéressant pour l'immunogénicité de la protéine que celle-ci soit ancrée dans la membrane cellulaire et ainsi correctement présentée au système immunitaire de l'hôte. C'est pourquoi

5 il est proposé, à partir de la précédente construction (F + signal rage), d'ajouter au niveau de la partie codant pour l'extrémité COOH terminale de la protéine F une séquence codant pour la portion transmembranaire provenant d'un virus hétérologue, celle de la glycoprotéine du virus rabique également.

10 La présente invention concerne tout d'abord l'utilisation de vecteurs viraux pour l'obtention de la protéine codée par le gène F du virus LAV dans des cultures cellulaires.

15 Il s'agit donc dans un premier temps de cellules de mammifères qui ont été infectées par un vecteur viral selon l'invention ou bien qui peuvent contenir l'ADN recombinant correspondant ; parmi ces cellules, il faut citer plus particulièrement les cellules diploïdes humaines, des cultures primaires ainsi que les cellules Vero. Bien entendu, il est possible de prévoir d'autres types de cellules comme cela ressortira d'ailleurs des exemples ci-après.

Les protéines ainsi obtenues peuvent être utilisées après purification pour la réalisation de vaccins.

20 Il est également possible de prévoir l'utilisation directe des vecteurs viraux selon l'invention afin d'effectuer une vaccination, la protéine F étant alors produite in situ et in vivo.

La présente invention concerne également les anticorps dressés contre les protéines F précédentes obtenus par infection d'un organisme vivant avec un vecteur viral tel que décrit précédemment et récupération des anticorps induits après un temps déterminé.

25 Enfin, la présente invention concerne la détection des anticorps dressés contre les protéines F précédentes ainsi que le procédé de diagnostic correspondant permettant, à partir de la détection de ces anticorps dans le prélèvement biologique d'un patient, de détecter in vitro le SIDA chez ce patient.

30 Les techniques mises en oeuvre pour l'obtention de la protéine F, les cultures cellulaires et les techniques de vaccination sont identiques à celles qui sont pratiquées actuellement avec les vaccins connus et ne seront pas décrites en détail.

La présente invention sera mieux comprise à la lecture des méthodes et exemples suivants.

Les figures suivantes illustrent les exemples :

5 . la figure 1 représente l'action de la tunicamycine sur les protéines synthétisées par les recombinants VV.TG.FLAV.1147 et VV.TG.FLAV.1145 et immunoprecipitées grâce à un sérum anti-LAV ; dans cette figure, les poids moléculaires sont donnés en kiloDaltons, et on représente par :

P : le culot cellulaire

S : le surnageant

10 - : les produits obtenus sans traitement

+ : les produits obtenus après traitement à la tunicamycine

1 : VV.TG.FLAV.1145

2 : VV.TG.FLAV.1147

3 : virus de la vaccine, type sauvage ;

15 . la figure 2 représente le criblage de sérum anti-LAV pour leur capacité à reconnaître la protéine F synthétisée par le virus recombinant VV.TG.FLAV.1145 ; les poids moléculaires sont exprimés en kilodaltons, et on représente par :

. 0 : virus de la vaccine, type sauvage

20 . 1 : VV.TG.FLAV.1145, clone C

. 2 : VV.TG.FLAV.1145, clone D

. - : sérum témoin négatif

. a, b, c, d, e : sérum de malades atteints de SIDA ;

25 . la figure 3 représente l'immunoprecipitation des protéines synthétisées par le recombinant VV.TG.1147 ; sur cette figure on désigne par :

. 1 : le virus vaccinal sauvage

. 2 : VV.TG.FLAV.1147

. a : le marquage des cellules BHK21 à la méthionine  $^{35}\text{S}$

. b : le marquage des cellules BHK21 au  $^{32}\text{PO}_4$

. c : le marquage des cellules BHK21 à l'acide myristique  $^3\text{H}$

les poids moléculaires sont en daltons ;

30 . la figure 4 représente l'immunoprecipitation d'extraits de cellules BHK21 infectées par les recombinants vaccinaux après marquage au  $^{32}\text{PO}_4$  ;

sur cette figure on désigne par :

- . - : l'immunoprecipitation sans addition de TPA
- . + : l'immunoprecipitation avec addition de TPA
- . P : le culot cellulaire
- 5 . S : le surnageant de culture

les poids moleculaires sont en daltons ;

la figure 5 représente l'immunoprecipitation des protéines synthétisées par le virus recombinant VV.TG.FLAV.1165 et marquées à la méthionine  $^{35}\text{S}$  ; sur cette figure on désigne par :

- 10 . 1 : les cellules infectées par VV.TG.FLAV.1145
- . 2 : les cellules infectées par VV.TG.FLAV.1165
- . 3 : les cellules infectées par VV.TG.FLAV.1147

les poids moleculaires sont en kilodaltons ;

les figures 6a et 6b représentent la réaction des anticorps de souris vaccinées avec les virus recombinants vis-à-vis de la protéine F produite dans *E. coli* et transférée sur nitrocellulose ;

15 sur la figure 6a :

- . les bandes 1 et 3 représentent le virus vaccine sauvage
- . les bandes 2, 4, 5, 8, 9 représentent le virus VV.TG.FLAV.1145

20 sur la figure 6b :

- . les bandes 1, 2 représentent le virus vaccine sauvage
- . la bande 3 représente le virus VV.TG.FLAV.1146
- . la bande 4 représente le virus VV.TG.FLAV.1147
- . les bandes 5, 6, 7, 8 représentent le virus VV.TG.FLAV.1165 .

## METHODES

Clonage : Maniatis et al., 1982.

Enzymes : Utilisées selon les prescriptions du fournisseur.

Mutagénèse localisée : Méthode dérivée de Zoller et Smith, 1983.

5 Transfert dans la vaccine : Kieny et al., 1984. Seule différence : les cellules humaines 143B remplacent les cellules LMTK<sup>-</sup>.

### Préparation du stock de virus

10 Les cellules primaires de poulet "germ free" sont infectées à 0,01 pfu/cellule pendant 4 jours à une température de 37°C (milieu MEM + 5 % NCS).

### Purification du virus

15 On effectue une centrifugation du stock de virus ci-dessus pendant 15 minutes à 2 500 tours (Rotor GSA Sorvall). Le surnageant est mis de côté. On reprend le culot dans un tampon RSB (Tris HCl 10 mM pH 7,4, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM) pendant 15 minutes à 4°C. On effectue un broyage au potter, puis une centrifugation pendant 15 minutes à 2 500 tours. Le surnageant est ajouté au précédent puis on effectue un deuxième broyage de la même façon.

20 Tous les surnageants sont déposés sur 10 ml de coussin de saccharose 36 % (p/v) (Tris 10 mM pH 8). On effectue une centrifugation pendant 2 heures à 14 000 tours (Rotor SW28, Beckman).

25 Le culot est repris, dissocié et remis sur un deuxième coussin identique. Le deuxième culot est repris dans 5 ml PBS et chargé sur un gradient 20-40 % de saccharose (Tris 10 mM pH 8) (même rotor). On effectue une centrifugation pendant 45 minutes à 12 000 tours.

On récupère la bande de virus -. Elle est culottée par centrifugation pendant 1 heure à 20 000 tours. Le culot est repris dans du Tris 10 mM pH 8.

Immunoprécipitations

On effectue une infection de cellules BHK21 (boîtes de 3 cm de diamètre,  $10^6$  cellules/boîte, cultivées en G-MEM + 10 % FCS) à 0,2 pfu/cellule pendant 18 heures. Le milieu est décanté et remplacé par 5 1 ml de milieu sans méthionine et 10  $\mu$ l de méthionine  $^{35}$ S (5 mCi/300  $\mu$ l) (Amersham) par boîte.

On ajoute un excès de méthionine non radioactive après 2 heures.

10 A la fin du marquage, on effectue un grattage des cellules infectées, une centrifugation pendant 1 minute dans une centrifugeuse Eppendorf, une séparation des fractions surnageant et culot, un lavage du culot une fois en tampon PBS, puis une immunoprécipitation et un gel (Selon Lathe et al., 1980).

Immunoprécipitation des protéines synthétisées en présence de tunicamycine

15 Après infection de cellules BHK21 comme décrit précédemment, on ajoute après 18 heures 1,5  $\mu$ g de tunicamycine par ml de milieu pendant 1 heure.

20 Le milieu est ensuite décanté et remplacé par 1 ml de milieu MEM sans méthionine contenant 1,5  $\mu$ g de tunicamycine et 10  $\mu$ l de méthionine  $^{35}$ S (Amersham). La suite de la manipulation s'effectue comme précédemment.

Traitements endo-F

25 Après immunoprécipitation des protéines marquées par un sérum de malade atteint du SIDA, la fraction protéine-A sepharose est reprise dans :

0,2 M phosphate de Na, pH 6,1  
0,05 % SDS  
0,1 % Nonidet P40  
0,1 % Beta-mercaptopéthanol  
30 0,1 % EDTA pH 8

et bouillie pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines.

On effectue une incubation pendant 20 heures à 37°C, avec 4 unités d'endo-F par ml, puis une précipitation pendant 2 minutes dans la

glace avec 1/5 de volume de TCA 100 %. On lave le culot 3 fois à l'acétone 80 %, on ajoute le tampon d'échantillons et on charge sur gel SDS.

Dosage des anticorps vaccine par test ELISA

Des plaques 96 trous (NUNC) à fond plat sont incubées pendant 18 heures à 37°C avec  $10^6$  pfu de virus de la vaccine type sauvage en tampon carbonate. Les plaques sont ensuite saturées avec de la gélatine 0,01 %. Les sérum de souris sont alors adsorbés sur les plaques et on effectue le reste du protocole comme pour un test ELISA classique.

Lectures à 492 nM.

10

EXEMPLE 1

Construction des plasmides hybrides

Les tailles combinées des différents éléments nécessaires pour le transfert de la séquence codant pour le gène env dans le génome de VV et son expression subséquente sont de l'ordre de plusieurs kb. Il a donc été jugé nécessaire de minimiser la taille du plasmide de réplication dans E. coli utilisé pour le travail de construction de façon à faciliter les manipulations nécessaires.

Le fragment HindIII (Hin-J) du génome de VV contient le gène complet de la thymidine kinase (TK) qui a déjà été utilisé précédemment pour permettre l'échange et la recombinaison de l'ADN inséré dans le génome de VV (Macket et al., 1982). Il est important de noter que le transfert d'un insert dans le gène TK du génome de VV crée un virus TK déficient qui peut être sélectionné. Il a tout d'abord été nécessaire de produire un plasmide de petite taille portant un site unique HindIII utilisable pour l'intégration du fragment Hin-J VV. En outre, il était nécessaire d'éliminer les séquences de restriction non nécessaires du plasmide de façon à permettre les manipulations suivantes.

La construction a été amorcée à partir du plasmide pML2 (Lusky et Botchan, 1981) qui est un vecteur dérivé du plasmide pBR322 par délétion spontanée dans lequel le segment entre les nucléotides 1089 et 2491 a été perdu. D'abord la séquence de PstI a été éliminée par insertion du fragment AhaIII-AhaIII de pUC8 (Vieira et Messing, 1982) entre deux

15

20

25

30

sites AhaIII de pML2 en éliminant 19 paires de bases. On a utilisé la méthode du "linker-tailing" (Lathe et al., 1984) pour insérer un linker HindIII entre les sites NruI et EcoRI traité par SI de ce plasmide, en éliminant le site BamHI.

5 Ceci conduit à un plasmide de 2049 paires de bases portant le gène betalactamase fonctionnel (conférant la résistance à l'ampicilline) et comportant en outre une origine de réplication active dans *E. coli* et un site de restriction unique HindIII.

10 Cette construction a été appelée pTGIH. Le fragment Hin-J de l'ADN de VV portant le gène TK a préalablement été cloné dans un vecteur provenant de pBR327 (Drillien et Spehner, 1983). Ce fragment de 4,6 kb a été recloné dans le site HindIII de pTGIH. Un clone a été sélectionné dans lequel le gène TK est situé distalement par rapport au gène codant pour la résistance à l'ampicilline.

15 Cette construction pTGIH-TK a été utilisée comme vecteur dans l'expérience suivante.

20 L'étape suivante a été d'isoler un promoteur de VV utilisable pour commander l'expression de la séquence codant pour le gène à exprimer. Le promoteur d'une gène précoce codant pour une protéine de 7 500 daltons (7,5K) a déjà été utilisé avec succès dans un but identique (Smith et al., 1983) et on a donc procédé à l'isolement de ce segment.

25 Le gène 7,5K est situé sur l'un des plus petits fragments SalI (fragment Sal-S) du génome de VV type WR (Venkatasan et al., 1981). Comme les petits fragments sont clonés de façon préférentielle, une grande proportion des clones obtenus par clonage direct de l'ADN de VV type WR coupé par SalI dans le plasmide pBR322 porte le fragment Sal-S. Ce fragment est transféré sur le bactériophage vecteur M13mp701 (Kieny et al., 1983) par digestion SalI et religation, en conduisant ainsi au phage M13TGSSal-S.

30 Dans ce clone, un site ScalI se trouve immédiatement à proximité de l'ATG d'initiation du gène 7,5K. En aval du gène 7,5K se trouvent situés des sites uniques BamHI et EcoRI provenant du vecteur.

5 Les sites BamHI et SCal sont fusionnés par l'intermédiaire d'un linker BglII 5'-CAGATCTG-3' après avoir complété les extrémités générées par digestion BamHI avec le fragment Klenow de la polymérase de *E. coli*. Ce procédé élimine le site Scal mais reconstitue le site BamHI et déplace le site unique EcoRI en aval. En même temps, le site Sall (AccI) en aval est éliminé, le site Sall en amont devient donc unique.

Cette construction est appelée M13TG 7,5K.

10 A l'intérieur du fragment Hind-J de l'ADN de VV se trouvent situés des sites CalI et EcoRI qui sont séparés par environ 30 paires de bases (Weir et Moss, 1983). Le fragment promoteur de 7,5K présent dans M13TG7,5K est excisé par AccI et EcoRI et cloné entre les sites CalI et EcoRI de pTGIH-TK pour générer pTGIH-TK-P7,5K.

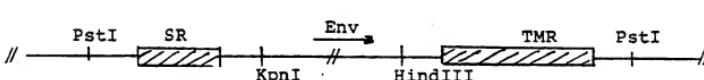
15 Cette construction conduit au transfert des sites BamHI et EcoRI uniques du vecteur M13 immédiatement en aval de la séquence du promoteur 7,5K. Ces sites uniques BamHI et EcoRI sont utilisés dans la construction suivante.

20 Le segment polylinker du bactériophage M13TG131 (Kieny et al., 1983) est excisé par EcoRI et BglII et inséré entre les sites EcoRI et BamHI du plasmide pTGIH-TK-P7,5K, générant pTGI86-poly. Dans cette construction, 5 sites de restriction uniques sont disponibles pour le clonage d'un gène étranger sous le contrôle de P7,5K (PstI, BamHI, SstI, SmaI, EcoRI).

#### EXEMPLE 2

##### Construction du plasmide portant la séquence F

25 Tout d'abord, le gène env du LAV entouré par les séquences signal et transmembranaire de la glycoprotéine du virus rabique a été inséré dans un plasmide (pTGI134) précédemment décrit. Le fragment PstI-PstI du plasmide pTGI134 est cloné dans le vecteur M13mp701 dans une orientation adéquate. Le bactériophage résultant est M13TG169 :



(SR = signal rage

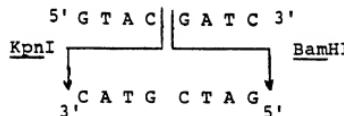
(TMR = transmembranaire rage

Le fragment génomique codant pour la protéine F est obtenu par une digestion BamHI-HindIII du plasmide pJ19-6, segment proviral cloné et décrit précédemment.

5 Le fragment BamHI-HindIII de pJ19-6 est cloné dans le vecteur M13TG169 ouvert aux sites KpnI et HindIII. Le site BamHI est relié au site KpnI par un linker oligonucléotide simple brin de séquence :

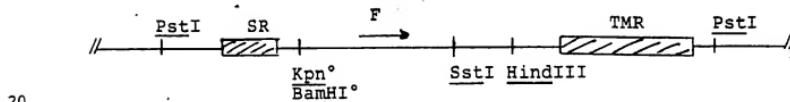
5'-GATCGTAC-3'

10



15

Le bactériophage résultant est appelé M13TG170 :



20

Afin de pouvoir exciser uniquement la séquence codante de la protéine F, un site BamHI est généré en amont de l'ATG d'initiation de la traduction, par mutagénèse dirigée par oligonucléotide.

25

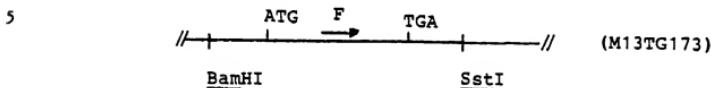


La séquence de l'oligonucléotide est :

30

5' GAAAGGATCCTGCTATAAG 3'  
BamHI

Après réparation et criblage des plages par l'oligonucléotide marqué au  $^{32}\text{P}$ , le phage M13TG173 est isolé. Il ne diffère du phage M13TG170 que par le site BamHI situé en amont de l'ATG d'initiation.



10 L'introduction de ce site permet de cloner le fragment BamHI-SstI qui contient le gène F dans le plasmide de transfert pTG186-poly ouvert aux sites BamHI et SstI et dont la construction a été décrite précédemment. Comme cela a été indiqué, l'expression d'une protéine hétérologue dans le virus de la vaccine nécessite que la séquence codante soit alignée avec une séquence du promoteur de la vaccine et soit 15 insérée dans un segment non essentiel de l'ADN de la vaccine. Cet ADN situé de part et d'autre permet la recombinaison avec le génome de la vaccine in vivo par une double recombinaison réciproque qui transfère la séquence codante et le promoteur accompagnant dans le génome de la vaccine. Le plasmide résultant est le plasmide pTG1147.

20 Le transfert de la séquence codante du gène F et du promoteur accompagnant dans le génome de la vaccine est effectué comme suit :

EXEMPLE 3

Clonage dans le virus de la vaccine

pour générer VV.TG.FLV.1147

25 La stratégie décrite par Smith et al., 1983 repose sur l'échange in vivo entre un plasmide portant un insert dans le gène VV TK et le génome viral de type sauvage de façon à inactiver le gène TK porté par le virus. Les virus TK<sup>-</sup> peuvent être sélectionnés par également sur une lignée cellulaire (TK négative) en présence de 5-bromodéoxyuridine (5BUDR) (Mackett et al., 1982). La thymidine kinase phosphoryle le 5BUDR en 5'-monophosphate, qui est ensuite converti en triphosphate. Ce composé 30 est un analogue de dTTP et son incorporation dans l'ADN bloque le

développement correct du virus. Un virus TK- peut néanmoins répliquer son ADN normalement et il conduit à des plages virales visibles dans une lignée cellulaire également TK-.

Le virus de la vaccine se propage dans le cytoplasme des cellules infectées plutôt que dans leur noyau. C'est pourquoi il n'est pas possible de tirer avantage de la machinerie de réplication et de transcription de l'ADN de l'hôte et il est nécessaire que le virion possède les composants pour l'expression de son génome. L'ADN de VV purifié est non infectieux.

Afin de générer les recombinants, il est nécessaire d'effectuer simultanément l'infection cellulaire avec du virion VV et une transfection avec le segment d'ADN cloné qui présente de l'intérêt. Toutefois, la génération des recombinants est limitée à la petite proportion des cellules qui sont compétentes pour la transfection par l'ADN. C'est pour cette raison qu'il a été nécessaire de mettre en oeuvre une stratégie de "congruence" indirecte pour réduire le bruit de fond des virus parentaux non-recombinants. Ceci a été effectué en utilisant comme virus infectieux vivant un mutant thermosensible (ts) de la vaccine qui n'est pas capable de se propager à une température non permissive de 39,5°C (Drillien et Spehner, 1983). Lorsque les cellules sont infectées par un mutant ts dans des conditions non permissives et transfectées avec l'ADN d'un virus de type sauvage, la multiplication virale interviendra seulement dans les cellules qui sont compétentes pour la transfection et dans lesquelles une recombinaison entre l'ADN viral sauvage et le génome du virus ts aura eu lieu ; aucun virus ne se multipliera dans les autres cellules, en dépit du fait qu'elles ont été infectées. Si un plasmide recombinant contenant un fragment de l'ADN de vaccine tel que pTG1147 est inclus dans le mélange de transfection, à la concentration appropriée, avec l'ADN du type sauvage, il est également possible d'obtenir qu'il participe à la recombinaison homologue avec l'ADN de la vaccine dans les cellules compétentes.

Des monocouches de cellules primaires de fibroblastes d'embryons de poulets (CEF) sont infectées à 33°C avec VV-Copenhague

ts7 (0,1 pfu/cellule) et transfectées avec un coprécipité au phosphate de calcium de l'ADN du virus de type sauvage VV-copenhague (50 ng/10<sup>6</sup> cellules) et le plasmide recombinant (50 ng/10<sup>6</sup> cellules).

Après incubation pendant 2 heures à une température qui ne permet pas le développement du virus ts (39,5°C), les cellules sont incubées de nouveau pendant 48 heures à 39,5°C. Des dilutions de virus ts<sup>+</sup> sont utilisées pour réinfecter une monocouche de cellules humaines 143B-TK<sup>-</sup> à 37°C qui sont ensuite incubées en présence de 5BUDR (150 µg/ml). Différentes plaques de virus TK<sup>-</sup> sont obtenues à partir de ces cellules qui ont reçu le plasmide recombinant, tandis que les cultures contrôles sans plasmide ne montrent pas de plaques visibles. Les virus TK<sup>-</sup> sont ensuite sous-clonés par une deuxième sélection en présence de 5BUDR.

Une double recombinaison réciproque correcte entre le plasmide hybride pTG1147 et le génome de VV aboutit à l'échange du gène TK portant l'insert avec le gène TK du virus, les recombinants devenant ainsi TK<sup>-</sup>.

Les ADN purifiés à partir des différents virus recombinants TK<sup>-</sup> sont digérés par HindIII et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments d'ADN sont transférés sur un filtre de nitrocellulose selon la technique décrite par Southern (1975). Le filtre est ensuite hybridé avec le plasmide pTG1147 nick-translaté au <sup>32</sup>P. Après lavage du filtre, ce dernier est fluorographié et des bandes de 3,85, 2,9, 0,8 kb sont visibles sur l'autoradiographie quand le virus vaccine a incorporé le gène F du LAV. L'un de ces recombinants VV.TG.FLAV.1147 a été sélectionné pour les études suivantes.

#### EXEMPLE 4

##### Protéine F synthétisée à partir d'un virus recombinant vaccine-LAV

Pour mettre en évidence l'expression du gène F du LAV à partir du virus vaccine hybride, on infecte des cellules de rongeur, BHK21, qui sont cultivées dans un milieu G-MEM + 10 % de sérum de veau foetal avec ledit recombinant VV.TG.FLAV.1147.

Une monocouche semi-confluente fraîche (10<sup>6</sup> cellules) est infectée avec 0,2 pfu/cellule et incubée pendant 18 heures.

Le milieu est ensuite éliminé et on ajoute un milieu à faible teneur en méthionine (1 ml pour  $10^6$  cellules) supplémenté avec 10  $\mu$ l/ml de méthionine  $^{35}\text{S}$  (5 mCi/300  $\mu$ l). Les cellules sont incubées à 37°C et les protéines marquées sont collectées par centrifugation. Après séparation en culot et surnageant, les protéines sont incubées avec un sérum appartenant à des patients atteints de SIDA. Les protéines réagissant avec le sérum sont récupérées par adsorption sur une résine protéine A-sépharose et étalées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide SDS et auto-radiographiées selon une technique décrite par Lathe et al., 1980. Les autoradiographies montrent que certains sérum des patients atteints du SIDA lient spécifiquement deux protéines des extraits cellulaires infectés. Les poids moléculaires apparents de 25,5 et 27 kd suggèrent l'équivalence avec la protéine F identifiée par des sérum de malades atteints du SIDA, dans une préparation de protéine F authentique et dans des extraits de cellules infectées par le virus LAV.

La séquence codant pour F conduit à un produit de traduction primaire d'environ 23 kd alors que la protéine F obtenue par le procédé précédent présente un poids moléculaire apparent compris entre 25 et 27 kd. Cette hétérogénéité peut être attribuée à une modification (acylation) et/ou être due au fait que deux ATG peuvent être utilisés pour l'initiation de la traduction de F.

#### EXEMPLE 5

##### Construction de pTG1145

Le plasmide pTG1145 contient le gène F dont la partie codant pour l'extrémité  $\text{NH}_2$  terminale de la protéine a été mise en phase avec la séquence signal de la glycoprotéine rabique. Les constructions dérivent du phage M13TG170 décrit auparavant.

La partie 5' du gène F est mise en phase avec la séquence signal de la glycoprotéine rabique au moyen d'une délétion générée par oligonucléotide.

Les quatre premiers acides aminés de la glycoprotéine rabique sont conservés pour favoriser un bon clivage du peptide signal.

5' Phe Gly Lys Phe Pro Ile Gly Gly Lys Trp Ser Lys 3'

TTT GGG AAA TTC CCT ATT GGT GGC AAG TGG TCA AAA

5

fin du 4 premiers F  
signal acides aminés (l'ATG d'initiation est  
rage de la glyco- déleté)  
protéine  
rabique

10

L'oligonucléotide servant à générer la boucle a pour  
séquence :

15

5' TTTTGACCACTGCCACCAATAGGAATTCCCAA 3'

On obtient ainsi le phage M13TG171. Le signal rage (SR) de la  
glycoprotéine rabique fusionné avec le gène F est ensuite transféré dans le  
plasmide pTG186-poly.

20

Pour ce faire, on clone le fragment PstI-PstI de M13TG171  
dans pTG186-poly ouvert au site PstI. Le plasmide résultant est nommé  
pTG1145. Le gène F fusionné avec le signal rage est transféré dans la  
vaccine comme décrit précédemment.

#### EXEMPLE 6

##### Construction de pTG1146

25

Dans ce plasmide, la séquence codant pour la zone trans-  
membranaire de la glycoprotéine rabique (TMR) est fusionnée avec la fin  
du gène F. Le codon TGA (stop) du gène F est compris dans la boucle de  
délétion générée par l'oligonucléotide, qui a pour séquence :

30

5' TGCACCTCAGTAATAACATAGCAGTTCTGAAGTACTC 3'

Glu Tyr Phe Lys Asn Cys Tyr Val Leu Leu Ser Ala  
GAG TAC TTC AAG AAC TGC TAT GTA TTA CTG AGT GCA

FTMR

On obtient ainsi le phage M13TG172.

Le gène F fusionné en amont avec le signal rage et en avai avec la portion transmembranaire rage est transféré dans le plasmide pTG186-poly.

5 Pour ce faire, on clone le fragment PstI-PstI de M13TG172 dans le plasmide pTG186-poly, ouvert par PstI pour générer le plasmide pTG1146.

#### EXEMPLE 7

##### Immunoprécipitation des protéines synthétisées par les virus recombinants VV.TG.FLAV.1145 et 1146

10 En opérant comme cela a été décrit précédemment pour le plasmide pTG1147, on obtient les vecteurs vaccine hybrides correspondant aux différents plasmides préparés précédemment.

15 Ces vecteurs viraux seront appelés respectivement :  
VV.TG.FLAV.1145  
VV.TG.FLAV.1146.

20 Les protéines obtenues comme cela a été décrit précédemment sont testées par immunoprécipitation (figure 1). Les immunoprécipités obtenus avec le produit de VV.TG.FLAV.1145 font apparaître une protéine dont le poids moléculaire apparent est aux environs de 28 kd. La protéine mise en évidence dans le surnageant du milieu de culture est d'un poids moléculaire apparent plus élevé. Il semble que le produit du gène F soit effectivement excrétré dans le surnageant de culture.

25 L'aspect diffus du signal autoradiographique suggérant l'existence d'une glycosylation, une manipulation de marquage à la <sup>35</sup>S méthionine en présence de tunicamycine a été conduite. En présence de tunicamycine, on obtient une protéine de poids moléculaire apparent de 26 kd, nettement inférieur à celui constaté auparavant. Ceci indique que le produit du virus VV.TG.FLAV.1145 est glycosylé. La présence du peptide 30 signal et de sites potentiels de N-glycosylation a entraîné une glycosylation de la protéine F. Comme la différence de poids moléculaire entre la protéine glycosylée et non glycosylée est de 2 kd, il est vraisemblable qu'un seul des deux sites de glycosylation soit utilisé.

La même expérience conduite avec le virus VV.TG.FLAV.1147 montre que le produit de ce virus n'est pas glycosylé.

Les immunoprecipités obtenus avec le produit de VV.TG.FLAV.1146 font apparaître une protéine de poids moléculaire apparent supérieur (34 kd) à ceux observés précédemment. On pouvait attendre ce résultat car le gène F est fusionné avec la partie terminale de la glycoprotéine rabique, comprenant la partie transmembranaire de cette dernière.

Il est également démontré, par marquage à la méthionine <sup>35</sup>S en présence de tunicamycine, que le produit de VV.TG.FLAV.1146 est glycosylé. L'excrétion observée est moindre que celle constatée avec VV.TG.FLAV.1145, indiquant que la protéine est bien ancrée à la surface des cellules.

Cela est confirmé par immunofluorescence selon une technique décrite précédemment. La surface des cellules apparaît nettement fluorescente par rapport à un témoin négatif, ce qui démontre la présence de la protéine F en surface des cellules.

#### EXEMPLE 8

##### Mise en évidence des anticorps anti-F chez des souris vaccinées avec les virus VV.TG.FLAV.1145, 1146 et 1147

Des souris Balb/c et C57/Bl mâles de 7 semaines sont vaccinées par injection sous-cutanée de  $5.10^7$  pfu ou par scarification de la base de la queue et application de  $2.10^7$  pfu de virus VV.TG.FLAV par animal. Elles reçoivent une injection de rappel avec la même dose après 2 semaines, et subissent une prise de sang au moment du rappel ainsi que 2 et 4 semaines après le rappel. La présence d'anticorps dirigés contre des déterminants du virus LAV et du virus de la vaccine dans leurs sérums est recherchée.

Tous les animaux vaccinés donnent des sérums capables de réagir avec le virus de la vaccine dans un test ELISA.

Des techniques d'immunoprecipitation ou de "Western Blot" ont été utilisées. Ces méthodes permettent de mettre en évidence les anticorps capables de réagir avec les protéines du virus LAV non dénaturées ou dénaturées au SDS dans un gel d'électrophorèse et transférées sur une

membrane de nitrocellulose. Dans cette expérience, les membranes de nitrocellulose employées sont obtenues par transfert des protéines contenues dans un extrait cellulaire infecté par le virus LAV selon des techniques connues. Ces membranes sont découpées en bandes et chaque bande est incubée avec le sérum des souris vaccinées (dilution au 1/20). La protéine A marquée à  $^{125}\text{I}$  permet de visualiser les protéines du virus LAV qui ont fixé des anticorps de souris.

Des extraits cellulaires infectés par le virus LAV et marqués à la cystéine  $^{35}\text{S}$  ont été utilisés pour les expériences d'immunoprecipitation.

Plusieurs sérum donnent une réaction spécifique avec une protéine de poids moléculaire autour de 27 kd, correspondant à la protéine F.

Il faut noter que les sérum de quelques souris produisent en "Western Blot" des signaux correspondant à des protéines non identifiées de la préparation de virus LAV fixée sur les membranes.

#### EXEMPLE 9

##### Myristylation de la protéine F

On a montré que des cellules BHK21 infectées par le recombinant VV.TG.FLAV.1147 expriment une protéine semblable à la protéine F native et qui se présente sous deux formes de poids moléculaires apparents de 25 et 27 kd en électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (figure 3).

La protéine F synthétisée par les cellules infectées par le virus HIV sauvage étant myristilée (Allan et al., 1985), l'existence d'une modification post-traductionnelle semblable a été recherchée sur la molécule synthétisée par le virus recombinant par marquage avec de l'acide myristique tritié.

Un tapis de cellules BHK21 ( $10^6$  cellules/boîte) est infecté avec le virus recombinant (à 0,2 pfu/cellule) ; 12 heures après l'infection on ajoute 100  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  d'acide myristique  $^{3}\text{H}$  (Amersham) dans du milieu MEM supplémenté en pyruvate de sodium 5 mM. Après 4 heures d'incubation les protéines marquées sont récoltées et immunoprecipitées avec un sérum de

malades atteints de SIDA. Les protéines ayant réagi avec les anticorps sont récupérées par adsorption sur une résine de protéine A-sépharose et séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS.

5 L'autoradiographie du gel montre que seule la forme de poids moléculaire apparent de 25 kd est myristilée ; la forme de 27 kd n'apparaît pas (figure 3).

L'expression de la protéine F par le virus de la vaccine recombinant permet donc d'obtenir une myristilation de la molécule semblable à celle de la molécule native synthétisée par le virus HIV.

10 Le myristate est probablement responsable de l'attachement de la molécule dans les membranes intracellulaires comme on l'observe pour d'autres protéines myristilées (Gould et al., 1985).

15

20

25

30

TABLEAU I

Comparaison des séquences de la protéine F du HIV-1, du HIV-2 (Guyader et al., 1987) et de la protéine p60src dans leur partie N-terminale, et de la partie intracytoplasmique proche de la membrane du récepteur EGF

9

10

15

20

25

30

↓

Myr G	G K W	S K S S	V V G W P	T V R E	R M R R A	E P A A	F HIV-1 <sub>SAV</sub>
M G A	S G S	K K H	S R P P	R G L	Q E R L L	F HIV-2 <sub>MOG</sub>	
Myr G S	S K S	K P K D P	S Q R R R	R S L	E P P D	pp60src	
Im // R R R H I	V R K R	A 14	T L R	R L L	Q E R E L	EGFr <sub>ec</sub>	

30 Le site de phosphorylation par la protéine kinase C de FHIV-1, pp60src et EGFrC est indiqué par la flèche. Myr = acide myristique ; tm = partie transmembranaire de la protéine EGFrC.

EXEMPLE 10Phosphorylation de la protéine F

La protéine F est myristilée (exemple 9) et se trouve ainsi ancrée dans la membrane au contact d'autres protéines membranaires. Il existe des analogies de séquence entre F et la protéine pp60src (Gould et al., 1985), également myristilée, et avec le récepteur EGF (Ullrich et al., 1984), dans sa partie intracytoplasmique proche de la membrane (tableau 1). Ces deux dernières protéines étant phosphorylées par la protéine kinase C sur un site proche de la membrane, il a été cherché si une telle modification existait pour F. Un site consensus de phosphorylation par la protéine kinase C existe effectivement sur la thréonine 15 de F (Woodgett et al. 1986).

Un tapis de cellules BHK21 ( $10^6$  cellules/boîte) est infecté avec le recombinant VV.TG.1147 (0,1 pfu/cellule) ; 12 heures après infection on ajoute 100  $\mu$ Ci/ml de  $^{32}\text{PO}_4$  (Amersham) dans du milieu MEM sans phosphate. Après 4 heures d'incubation, on effectue une immunoprécipitation et une électrophorèse sur gel, comme décrit dans l'exemple 4.

La figure 3 montre que la protéine de 25 kd. qui est myristilée est également phosphorylée. Cette protéine est résolue en deux bandes : P25-1 et P25-2. Si l'on ajoute au milieu de culture, 10 minutes avant immunoprécipitation, l'ester de phorbol 12-tetradecanoyl phorbol-13-acétate (TPA), on observe une augmentation très nette de la phosphorylation pour la P25-1. Cela est en accord avec une phosphorylation par la protéine kinase C dont l'activité est très fortement augmentée par le TPA (figure 4).

De nombreux isolats de HIV possèdent un gène F dont la thréonine 15 est remplacée par une alanine (Ratner et al., 1985). La protéine F de tels isolats est donc théoriquement non phosphorylable. Pour vérifier ce point, on a construit un recombinant exprimant une protéine F ayant une alanine en position 15.

La P25-2 peut correspondre soit à une forme de F phosphorylée sur un autre acide aminé que la Thr15, soit à une protéine cellulaire immunoprécipitée avec F.

EXEMPLE 11Construction du plasmide pTG1191

Le plasmide pTG1191 contient le gène F provenant du plasmide pJ19-6 mais dont la thréonine en position 15 est remplacée par une alanine. Les constructions dérivent du phage M13TG170 décrit précédemment (exemple 2). La mutation thréonine-alanine est effectuée au moyen de l'oligonucléotide de séquence :

5' TCTTTCCCTCACTGCAGGCCATCC 3'

On obtient ainsi le phage M13TG1151. Le gène F-Ala est ensuite transféré dans le plasmide pTG186-poly. Pour ce faire, on clone le fragment BamHI-SstI de M13TG1151 dans le pTG186-poly ouvert aux mêmes sites. Le plasmide résultant est nommé pTG1191. Le transfert du gène F-Ala dans la vaccine est effectué comme décrit précédemment.

EXEMPLE 1215 Immunoprécipitation des protéines synthétisées par le virus recombinant VV.TG.FLAV.1151

En opérant comme cela a été décrit précédemment pour le plasmide pTG1147, on obtient le vecteur viral VV.TG.FLAV.1151.

20 Les protéines obtenues sont examinées par immunoprécipitation après marquage à la  $^{35}$ S méthionine comme décrit précédemment. Les protéines obtenues et visualisées sur gel SDS sont identiques à celles induites par le recombinant VV.TG.FLAV.1147 (non montré).

25 Si l'on effectue un marquage au phosphate  $^{32}$ PO<sub>4</sub> comme décrit plus haut, on ne visualise plus la forme P25-1 induite par le recombinant VV.TG.FLAV.1147. De plus, l'addition de TPA dans le milieu ne modifie pas la phosphorylation de la forme P25-2 (figure 4).

30 Ces résultats indiquent que le site de phosphorylation par la protéine kinase C est la thréonine 15. Le fait que la protéine F de certains isolats ne soit pas phosphorylable par la PKC peut impliquer une activité biologique différente pour ces isolats. En effet, la phosphorylation par la PKC constitue généralement une régulation de l'activité de ses substrats (voir revue par Nishizuka, 1986).

EXEMPLE 13Construction du plasmide pTG1165

Il a été montré que l'immunogénicité de la protéine F était accrue si celle-ci était couplée à une zone hydrophobe en C-terminal (recombinant VV.TG.FLAV.1146). Cependant, il est apparu que la conformation de la protéine n'était pas correcte car celle-ci est alors très peu reconnue par des anticorps d'individus séropositifs. Il a donc été entrepris la construction d'un virus recombinant exprimant la protéine F couplée à un peptide hydrophobe en N-terminal. Ce peptide jouerait ainsi le rôle de l'acide myristique, tout en assurant un ancrage plus solide de la protéine dans la membrane cellulaire. Ce recombinant a été construit à partir du recombinant VV.TG.FLAV.1145 décrit précédemment. Le présent exemple concerne donc l'utilisation d'un vecteur viral exprimant une protéine F plus immunogène que la protéine F non modifiée, et ayant une conformation similaire à la protéine native.

Le plasmide pTG1165 contient donc le gène F dont la partie codant pour l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale de la protéine a été mise en phase avec la séquence signal de la glycoprotéine rabique, cette séquence signal était mutée afin de supprimer le clivage in vivo entre le peptide signal hydrophobe et la protéine F. Les constructions dérivent du phage M13TG171 décrit précédemment (exemple 5).

Le site de clivage est situé entre la glycine terminale du peptide signal et la lysine N-terminale de la glycoprotéine rabique. Afin de supprimer le clivage, la glycine située en -1 du site de clivage a été mutée en tryptophane, la phénylalanine en -2 a été mutée en isoleucine et la proline en -5 en leucine. Ces mutations ont été réalisées au moyen de l'oligonucléotide de séquence :

5' AGGGAATTCATAAACACAATAGAAAAACCAAG 3'

On obtient ainsi le phage M13TG1107. La séquence signal mutée de la glycoprotéine rabique fusionnée avec le gène F est ensuite transférée dans le plasmide pTG186-poly.

Pour ce faire, on clone le fragment PstI-PstI de M13TG1107 dans le pTG186-poly ouvert au site PstI. Le plasmide résultant est nommé pTG1165. Le gène F fusionné avec la séquence signal de la rage mutée est transféré dans la vaccine comme décrit précédemment.

EXEMPLE 14Immunoprecipitation des protéines synthétisées par  
le virus recombinant VV.TG.FLAV.1165

En opérant comme cela a été décrit pour le plasmide pTG1147, 5 on obtient le virus de la vaccine recombinant correspondant au plasmide pTG1165 et dénommé VV.TG.FLAV.1165. Les protéines obtenues comme cela a été décrit précédemment sont testées par immunoprecipitation (figure 5).

10 Les immunoprecipités obtenus avec le produit de VV.TG.FLAV.-1165 font apparaître une protéine dont le poids moléculaire apparent est de 26000 daltons. La protéine est absente dans les surnageants de culture. Une manipulation de marquage à la  $^{35}\text{S}$  méthionine en présence de tunicamycine indique que la protéine obtenue n'est pas glycosylée.

EXEMPLE 15Mise en évidence des anticorps anti-F chez des souris  
vaccinées avec les virus VV.TG.FLAV.1165

15 Des souris Balb/C femelles de 7 semaines sont vaccinées par scarification à la base de la queue comme décrit dans l'exemple 8. La détection des anticorps s'effectue par technique de "Western blot". La protéine F produite dans *E. coli* est transférée sur nitrocellulose, des 20 bandelettes sont découpées et incubées avec les sérum des animaux vaccinés (figure 6a). La réaction observée est environ 3 à 5 fois plus forte pour le recombinant VV.TG.FLAV.1165 que pour le recombinant VV.TG.-FLAV.1147, et équivalente à celle du recombinant VV.TG.FLAV.1196 (figure 6b). Cependant, l'utilisation du recombinant VV.TG.FLAV.1165 est 25 préférable car la protéine synthétisée est parfaitement reconnue par des anticorps d'individus séropositifs, donc sa conformation est correcte. Le recombinant VV.TG.FLAV.1165 semble être le meilleur candidat pour un vaccin contre la protéine F.

Dépôt des souches représentatives de l'invention :

Le phage M13mp701 et le plasmide pTG1134 sont décrits dans la demande de brevet n° 86 05043 du 8 avril 1986.

5 Le plasmide pJ19-6 a été déposé le 16 novembre 1984 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur sous le n° 366-I et est décrit dans le brevet anglais n° 84 29099.

La souche suivante a été déposée le 6 juin 1986 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur :  
- E. coli transformé pTG1147 sous le n° I-561.

10

15

20

25

30

REFERENCES

1. Allan J.S., Coligan J.E., Lee T.H., McLane M.F., Kanki P.J., Groopman J.E. et Essex M. (1985) *Science* 230, 810-813.
- 5 2. Auffray C. (1986) *C.R. Acad. Sc. Paris* 302 série III, N° 8, 287-292.
3. Arya K.S. et Gallo R.C. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2209-2213.
4. Drillien R., Spehner D. (1983) *Virology* 131, 385-393.
5. Gould K.L., Woodgett J.R., Cooper J.A., Buss J.E., Shalloway D.F. et Hunter T. *Cell* 42, 849-857 (1985).
- 10 6. Guyader M., Guerneau M., Sonigo P., Clavel F., Montagnier L. et Alizon M. *Nature* 328, 662-669 (1987) 5.
7. Kieny M.P., Lathe R. et Lecocq J.P., 1983, *Gene* 26 : 91-99.
8. Kieny M.P., Lathe R., Drillien R., Spehner D., Skory S., Schmitt D., Wiktor T., Koprowski H. et Lecocq. J.P. (1984) *Nature* 312: 163-166.
- 15 9. Lathe R., Hirth P., Dewilde M., Harford N et Lecocq J.P., 1980, *Nature* 284 : 473-474.
10. Lathe R., Kieny M.P., Schmitt D., Curtis P., Lecocq J.P. (1984) *J. Mol. Appl. Genet.*, vol. 2, 331-342.
- 20 11. Lathe R. Kieny M.P., Skory S. et Lecocq J.P. (1984) *DNA*, vol. 3, 173-182.
12. Lusky M., Botchan M. (1981) *Nature* 293? 79-81.
13. Mackett M., Smith G.L., et Moss B., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 7415-7419.
- 25 14. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982) *Cold Spring Harbor Lab.* N.Y.
15. Muesing M.A., Smith D.H., Cabradilla C.D., Benton C.V., Lasky L.A. et Capon D.J. (1985) *Nature* 313 : 450-458.
16. Messing et Vieras, *Gene* 19, (1982) 269-276.
- 30 17. Nishizuka Y., (1986) *Science* 233, 305-312.
18. Panicali D. et Paoletti E. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 4927-4931.
19. Panicali D., Davis S.W., Weinberg R.L., Paoletti E. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5364-5368.

20. Ratner L., Haseltine W., Patarca R., Livak K.J., Starcich B., Josephs S.F., Doran E.R., Rafalski J.A., Whitehorn E.A., Baumeister K., Ivanoff L., Petterway Jr. S.R., Pearson M.L., Lautenberger J.A., Papas T.S., Ghrayeb J., Chang N.T., Gallo R.C. et Wong-Staal F. (1985) 313 : 277-284.

5 21. Ratner L., Stracich B., Joseph S.F., Hahn B.H., Reddy E.P., Livak K.J., Petterway S.R., Pearson M.L., Haseltine W.A., Arya K.S. et Wong-Staal F. (1985) Nucleic Acids Research, 13, 8219-8229.

10 22. Sanchez-Pescador et al. (1985) Science, 227 : 484-492.

23. Smith G.L., Mackett M., Moss V. (1983) Nature 302 : 490-495.

15 24. Smith G.L., Murphy B.R., Moss B. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7155-7159.

25. Ullrich et al. Nature 309 : 418-425 (1984).

26. Venkatesan S., Baroudy B.M., Moss B. (1981) Cell 125 : 805-813.

15 27. Wain-Hobson S., Sonigo P., Danos O., Cole S. et Alizon M. (1985) Cell 40 : 9-17.

28. Weir J.P., Moss B. (1983) J. Virol. 46 : 530-537.

29. Woodgett J.R., Gould K.L. et Hunter T. Eur. J. Biochem. 161 : 177-184 (1986).

20 30. Zoller M.J. et Smith M. (1983) Methods in Enzymology (Wu, Grossman, Moldave, eds.) 100 : 468-500.

REVENDICATIONS

- 1) Vecteur viral caractérisé en ce qu'il comporte au moins :
  - . une partie du génome d'un virus,
  - . un gène codant pour la protéine F du virus responsable du SIDA,
  - . ainsi que les éléments assurant l'expression de cette protéine dans des cellules.
- 5 2) Vecteur viral selon la revendication 1, caractérisé en ce que la partie du génome d'un virus est une partie du génome d'un poxvirus.
- 10 3) Vecteur viral selon la revendication 2, caractérisé en ce que le poxvirus est la vaccine.
- 4) Vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence signal et/ou une séquence transmembranaire provenant d'un virus hétérologue.
- 15 5) Vecteur viral selon la revendication 4, caractérisé en ce que la séquence signal et/ou la séquence transmembranaire provenant d'un virus hétérologue provient du virus de la rage.
- 6) Vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le gène codant est le gène F total comportant depuis l'extrémité 5' :
  - . la séquence signal du gène G du virus de la rage,
  - . le gène F total,
  - . la zone transmembranaire (TM) du gène G.
- 20 7) Vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la séquence d'ADN codant pour la protéine F est sous la dépendance d'un promoteur d'un gène du poxvirus.
- 8) Vecteur viral selon la revendication 7, caractérisé en ce que le promoteur est un promoteur du gène de la vaccine.
- 30 9) Vecteur viral selon la revendication 8, caractérisé en ce que la séquence d'ADN codant pour la protéine F est sous le contrôle du promoteur du gène de la protéine 7,5K de la vaccine.
- 10) Vecteur viral selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que la séquence codant pour la protéine F est clonée dans le gène TK de la vaccine.

11) ADN recombinant correspondant à un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 10.

12) Culture de cellules de mammifères infectées par un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 10 ou comportant un ADN selon la revendication 11.

13) Procédé de préparation de la protéine F du virus responsable du SIDA, caractérisé en ce qu'on cultive des cellules selon la revendication 12 et qu'on récupère la protéine F produite.

14) Protéine F de virus responsable du SIDA obtenue par mise en oeuvre du procédé selon la revendication 13.

15) Protéine selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle comporte, en outre, une partie de glycoprotéine de la rage.

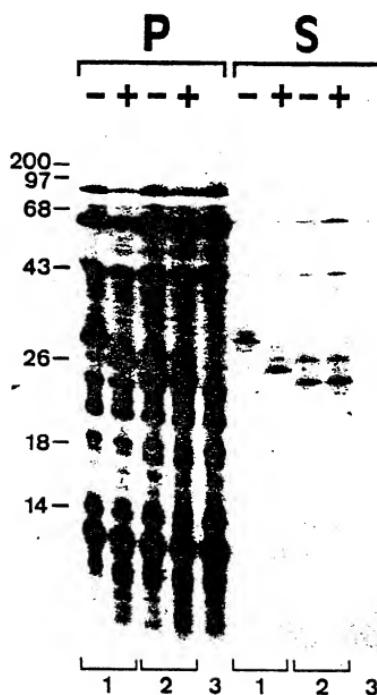
16) Protéine selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle comporte, en outre, un peptide hydrophobe en position N-terminale.

17) Vaccin caractérisé en ce qu'il est constitué par un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 10 et/ou par la protéine selon l'une des revendications 14 à 16.

18) Anticorps dressés contre la protéine F du virus responsable du SIDA, caractérisés en ce qu'on inocule un organisme vivant avec un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 10 ou avec les protéines obtenues selon l'une des revendications 14 à 16 et en ce qu'on récupère les anticorps formés après un temps déterminé.

19) Procédé de diagnostic in vitro du SIDA chez un patient par mise en évidence des anticorps de la revendication 18 dans un prélèvement biologique dudit patient.

1 / 7

FIG.1

2 / 7

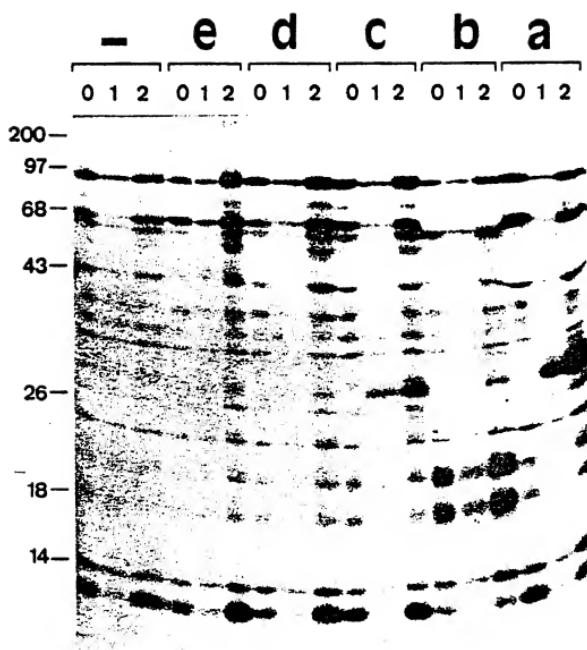


FIG 2

3 / 7

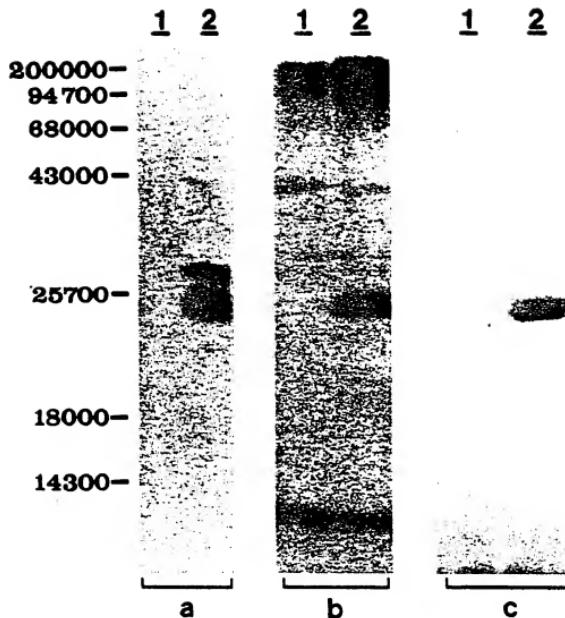
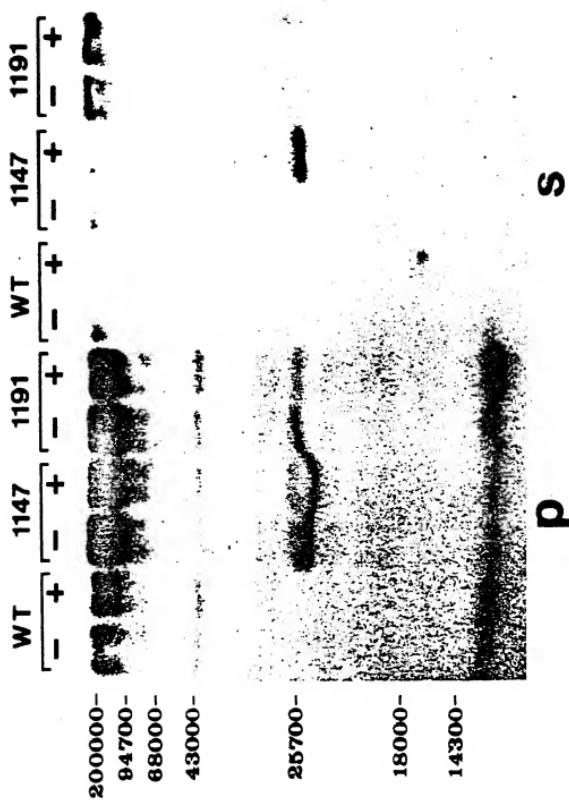


FIG. 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT

4 / 7

FIG. 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT

5 / 7

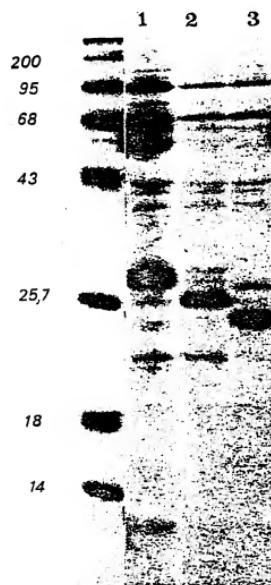
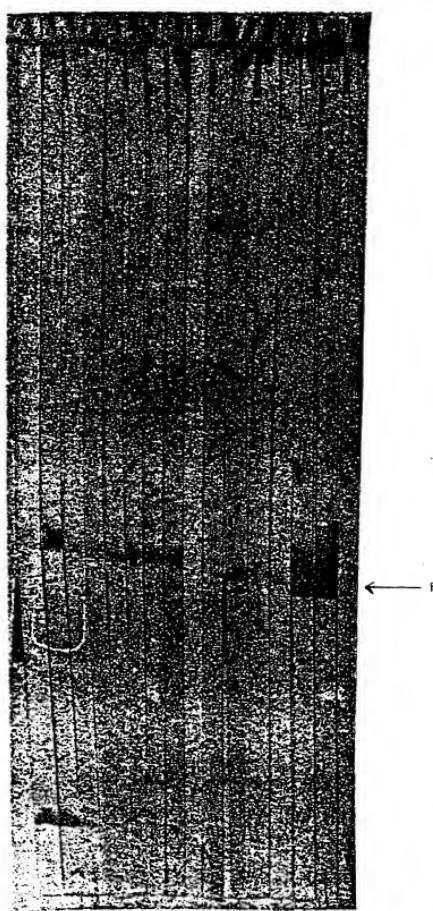


FIG. 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT

6 / 7



FIG\_6a

FEUILLE DE REMplacement

7 / 7

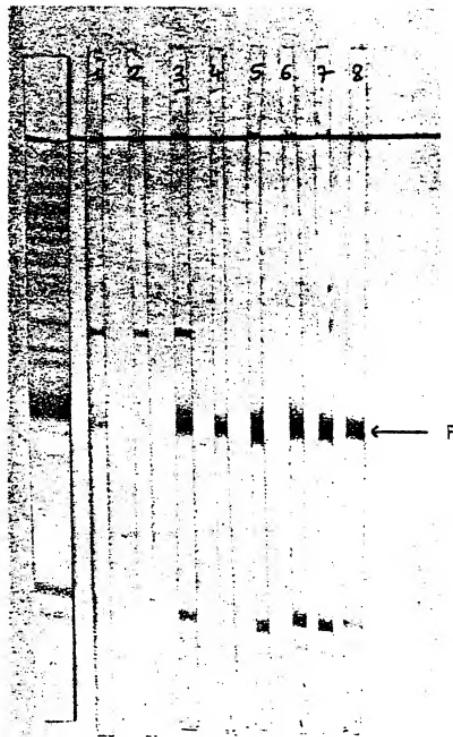


FIG. 6b

FEUILLE DE REMPLACEMENT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 87/00219

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) \*

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC  
 Int.Cl.: C 12 N 15/00; C 12 N 5/00; C 12 P 21/02; C 07 K 15/04;  
 C 07 K 15/06; G 01 N 33/569; A 61 K 39/21; A 61 K 39/285

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched \*

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl. <sup>4</sup>	C 12 N 15; G 01 N 33; A 61 K 39
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *	

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT \*

Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences USA, volume 83, April 1986, S.K. Arya et al.: "Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III: Immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients", pages 2209-2213, see the whole article, specially figure 2 cited in the application	1-19
Y	Nature, volume 312, No: 5990, 8 November 1984, (Reading, Berks, GB), M.P. Kieny et al.: "Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus", pages 163-166, see the whole article cited in the application	1-19
A	Nature, volume 320, 10 April 1986, (Reading, Berks, GB), Shiu-Lok Hu et al.:	./.

\* Special categories of cited documents: <sup>10</sup>

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document for other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

14 September 1987 (14.09.87)

Date of Mailing of this International Search Report

09 October 1987 (09.10.87)

International Searching Authority

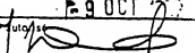
Signature of Authorized Officer

European Patent Office

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	"Expression of Aids virus envelope gene in recombinant vaccinia viruses", pages 537-540, see the whole article -----	1-3, 7-14 17-19
A	Nature, volume 320, 10 April 1986, (Reading, Berks, GB), Sekhar Chakrabarti et al.: "Expression of the HTLV-III envelope gene by a recombinant vaccinia virus", pages 535-537, see the whole article -----	1-3, 7-14, 17-19

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N° PCT/FR 87/00219

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB : C 12 N 15/00; C 12 N 5/00; C 12 P 21/02; C 07 K 15/04; C 07 K 15/06; G 01 N 33/569; A 61 K 39/21; A 61 K 39/285		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB <sup>4</sup>	C 12 N 15; G 01 N 33; A 61 K 39	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>11</sup>	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>12</sup>
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences USA, volume 83, avril 1986, S.K. Arya et al.: "Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III: Immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients", pages 2209-2213, voir l'article en entier, surtout figure 2 cité dans la demande	1-19
Y	Nature, volume 312, no. 5990, 8 novembre 1984, (Reading, Berks, GB), M.P. Kieny et al.: "Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus", pages 163-166, voir l'article en entier cité dans la demande	1-19
A	Nature, volume 320, 10 avril 1986, (Reading, Berks, GB), Shiu-Lok Hu et al.: "Expression of Aids virus ./."	. /.
<p>* Catégories spéciales de document cités: <sup>11</sup></p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non nécessairement particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais oublié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant éter un soutir sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constitutif de l'invention revendiquée</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventrice</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée a été combinée comme, par exemple, une activité inventrice avec le document, est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« &amp; » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  14 septembre 1987	Date d'exécution du présent rapport de recherche internationale  14 OCT 1987	
Administration chargée de la recherche internationale  OFFICE EUROPÉEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé  M. VAN MOL 	

**III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS**  
**(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
	envelope gene in recombinant vaccinia viruses", pages 537-540, voir l'article en entier	1-3, 7-14, 17-19
A	Nature, volume 320, 10 avril 1986, (Reading, Berks, GB), Sekhar Chakrabarti et al.: "Expression of the HTLV-III envelope gene by a recombinant vaccinia virus", pages 535-537, voir l'article en entier	1-3, 7-14, 17-19
	-----	

THIS PAGE BLANK (USPTO)